



Universidad de Cuenca
Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Bioquímica y Farmacia

“Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género *Epidendrum*”

*Trabajo de titulación previo a
la obtención del Título de
Bioquímico Farmacéutico*

Autores:

Christian Andrés Bermeo Criollo
C.I.: 0106557507

Francisco Alberto Sari Cumbe
C.I.: 0924207467

Directora:

Blga. María Elisa Durán López, MSc.
C.I.: 0104249958

Asesora:

Dra. María Elena Cazar Ramírez PhD.
C.I.: 0602243800

Cuenca - Ecuador

2018



RESUMEN

En la naturaleza, las semillas de orquídeas germinan solo después de la colonización con un hongo micorrízico. En el presente estudio se probaron dos hongos micorrízicos para la germinación simbiótica de semillas y el desarrollo protocormos de orquídeas *Epidendrum* del Orquideario de la Universidad de Cuenca. Se emplearon métodos asimbióticos (MS) y métodos simbióticos (OMA inoculados con los hongos micorrízicos *Ceratobasidium* sp. y *Sebacina vermifera*), utilizando el medio MS como control positivo y el medio OMA no inoculado como control negativo. Los porcentajes de germinación, el desarrollo de protocormos y los índices de crecimiento se determinaron a los 30 y 60 días del cultivo. La eficiencia de la germinación, el desarrollo de protocormos y los índices de crecimiento fueron mejores cuando se utilizó los medios simbióticos. Las semillas germinaron a tasas más altas cuando se cultivaron con la cepa fúngica de *Ceratobasidium* sp. que con la cepa de *Sebacina vermifera* o asimbióticamente en medio MS durante un período de cultivo de 60 días. El análisis de resultados permite concluir que el crecimiento de semillas de orquídeas es optimizado en asociación micorrízica con *Ceratobasidium* sp. y *Sebacina vermifera*.

Palabras Claves: ORQUÍDEA, MICORRIZA, SIMBIOSIS, *CERATOBASIDIUM* SP., *SEBACINA VERMIFERA*.



ABSTRACT

In nature, orchid seeds germinate only after their colonization with a mycorrhizal fungus. In this study two mycorrhizal fungi were evaluated for symbiotic seed germination and protocorm development of *Epidendrum* orchids, in the orchid greenhouse of University of Cuenca. Asymbiotic media (Murashige & Skoog) and symbiotic media (Medio Oat Meal Agar media inoculated with the mycorrhizal fungus *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera*) were enveloped, using MS media as a positive control and non-inoculated OMA media as a negative control. Germination percentages, protocorm development and growth indices were determined at 30 and 60 days of culture. Germination efficiency, protocorm development and growth indices were the best in symbiotic media. Seeds germinated at higher rates when cultured with fungal strain *Ceratobasidium* sp, than with strain *Sebacina vermifera* or asymbiotically on Murashige & Skoog medium during a 60-days culture period. These results allowed us to conclude that growth is optimum with mycorrhizae association of *Ceratobasidium* sp. and *Sebacina vermifera*.

Key words: ORCHID, MYCORRHIZA, SYMBIOSIS, *CERATOBASIDIUM* SP., *SEBACINA VERMIFERA*.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE GRÁFICOS	8
DEDICATORIA	13
AGRADECIMIENTOS.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS	16
OBJETIVO GENERAL.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
1 ORQUÍDEAS.....	17
1.1 GENERALIDADES.....	17
1.2 ORQUÍDEAS NATIVAS DE ECUADOR.....	18
1.3 <i>EPIDENDRUM SECUNDUM JACQ.</i>	18
2 HONGOS MICORRÍZICOS	19
2.1 GENERALIDADES.....	19
2.2 CLASIFICACIÓN DE MICORRIZAS	19
3 GERMINACIÓN	21
3.1 FISIOLOGÍA.....	21
3.2 LA MICROPROPAGACIÓN.....	21
3.3 FACTORES A CONSIDERAR PARA EL CULTIVO “IN VITRO” DE ORQUÍDEAS.....	22
3.4 GERMINACIÓN SIMBIÓTICA.....	23



4	MEDIOS PARA CULTIVO “IN VITRO” DE ORQUÍDEAS	24
5	MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1	ÁREA DE ESTUDIO	26
5.2	MÉTODOS	26
5.2.1	Colecta y procesamiento de las semillas de orquídea del género <i>Epidendrum</i>	26
5.2.2	Formulación de medios de cultivo para ensayos de germinación “in vitro” 28	
5.2.3	Ensayos de Germinación “in vitro” en condiciones asimbióticas y simbióticas	28
5.2.4	Incubación de las cajas con cultivo simbiótico	29
5.2.5	Conservación	29
5.2.6	Análisis de la germinación	29
5.2.7	Medición de la altura alcanzada por las plántulas en estadio 5 a los 60 días de la siembra	31
5.2.8	Estimación del porcentaje de germinación de semillas	32
6	RESULTADOS	33
6.1	DISEÑO DE ENSAYO DE GERMINACIÓN “IN VITRO” EN CONDICIONES SIMBIÓTICAS Y ASIMBIÓTICAS	33
6.2	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE GERMINACIÓN	34
6.3	EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA GERMINACIÓN CON RESPECTO AL TIEMPO	35
6.4	DÍAS DE APARICIÓN DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS	36
6.5	COMPARACIÓN DE GERMINACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS SIMBIÓTICOS	37
6.6	PORCENTAJES DE GERMINACIÓN DE TRATAMIENTOS SIMBIÓTICOS VS. ASIMBIÓTICOS	37
6.7	ÍNDICE DE CRECIMIENTO (IG)	38
6.8	ALTURA ALCANZADA POR LAS PLÁNTULAS EN ESTADIO 5 (E5)	39



6.9	MICROCULTIVO DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS EMPLEADOS	39
7	DISCUSIÓN	40
7.1	DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR EFICIENCIA DE GERMINACIÓN EN CONDICIONES SIMBIÓTICAS Y ASIMBIÓTICAS	40
7.2	MORFOLOGÍA DE SEMILLAS DEL GÉNERO <i>EPIDENDRUM</i> EN PROCESO DE GERMINACIÓN	40
7.3	EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN CON RESPECTO AL TIEMPO	40
7.4	COMPARACIÓN DE GERMINACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS SIMBIÓTICOS	41
7.5	GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO EN TRATAMIENTOS SIMBIÓTICOS VS. ASIMBIÓTICOS.....	42
8	CONCLUSIONES.....	44
9	RECOMENDACIONES	45
10	BIBLIOGRAFÍA.....	46
11	ANEXOS.....	52
	ANEXO A. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	52
	ANEXO A1. SOLUCIONES MADRE: PREPARACIÓN DE 100 ML.....	52
	ANEXO A2. MEDIO MS MODIFICADO COCO:.....	52
	ANEXO A3. MEDIO PDA (AGAR PAPA DEXTROSA):	52
	ANEXO A4. MEDIO OMA (AGAR AVENA):	52
	ANEXO B. VISUALIZACIÓN DE CAMPOS CON LENTE DE AUMENTO A LOS 30 Y 60 DÍAS POSTERIORES A LA SIEMBRA	53
	ANEXO C. FOTOS COMPARATIVAS DE LOS TRES ENSAYOS	54
	ANEXO C1. FOTOS COMPARATIVAS DE LOS TRES ENSAYOS A LOS 30 DÍAS	54
	ANEXO C2. FOTOS COMPARATIVAS DE LOS TRES ENSAYOS A LOS 60 DÍAS	55
	ANEXO D. FOTOS COMPARATIVAS DE LOS TRES ENSAYOS A LOS 60 DÍAS .	56
	ANEXO E. FOTOS COMPARATIVAS LUEGO DE LOS 60 DÍAS	57



ANEXO F. RESULTADOS DEL MICROCULTIVO	58
ANEXO G. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN DE LOS TRES ENSAYOS.....	59
ANEXO H. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN SIMBIÓTICA	60
ANEXO H1. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN SIMBIÓTICA CON <i>CERATOBASIDIUM</i> SP. DURANTE EL TIEMPO DE EVALUACIÓN DE LOS TRES ENSAYOS.....	60
ANEXO H2. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN SIMBIÓTICA CON <i>SEBACINA</i> <i>VERMIFERA</i> DURANTE EL TIEMPO DE EVALUACIÓN DE LOS TRES ENSAYOS	60
ANEXO I. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS DE LA SIEMBRA	61
ANEXO I1. PRIMER ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS DE LA SIEMBRA.....	61
ANEXO I2: SEGUNDO ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS DE LA SIEMBRA.....	61
ANEXO I3. TERCER ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS DE LA SIEMBRA.....	61
ANEXO J. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS DE LA SIEMBRA	62
ANEXO J1. PRIMER ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS DE LA SIEMBRA.....	62
ANEXO J2. SEGUNDO ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS DE LA SIEMBRA.....	62
ANEXO J3. TERCER ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS DE LA SIEMBRA.....	62
12 GLOSARIO.....	63



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Epidendrum secundum</i> del Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzaín.....	19
Figura 2. Cápsulas maduras de <i>Epidendrum</i> recolectadas del Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzaín.....	27
Figura 3. Semillas de <i>Epidendrum</i> viables y no viables.....	27
Figura 4. Diseño de cuadrícula dibujada al reverso de las cajas sembradas.....	30
Figura 5. Estadios de germinación de orquídeas.....	31
Figura 6. Medición de la altura alcanzada por las plántulas en estadio 5.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de los tratamientos simbióticos y asimbióticos.....	28
Tabla 2. Estadios de desarrollo, basadas en una modificación de la metodología de Zettler & Hofer (1998).....	30
Tabla 3. Detalle de las cajas sembradas en los tres ensayos.....	33
Tabla 4. Detalle de estructuras morfológicas de semillas de <i>Epidendrum</i> , en cada estadio de germinación.....	34
Tabla 5. Germinación según los días de inspección.....	36
Tabla 6. Días de aparición de los 5 estadios de los tres ensayos.....	36
Tabla 7. Índice de germinación (IG).....	38
Tabla 8. Altura alcanzada por las plántulas en Estadio 5 a los 60 días.....	39

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparación de eficiencia como promotor de germinación entre <i>Ceratobasidium</i> sp. y <i>Sebacina vermifera</i>	37
Gráfico 2. Comparación de eficiencia de germinación de tratamientos vs. Controles.....	38



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Christian Andrés Bermeo Criollo en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquideas del género *Epidendrum*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, Mayo de 2018

Christian Andrés Bermeo Criollo

0106557507



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Francisco Alberto Sari Cumbe en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquideas del género *Epidendrum*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, Mayo de 2018

Francisco Alberto Sari Cumbe

0924207467



Cláusula de Propiedad Intelectual

Christian Andrés Bermeo Criollo, autor del trabajo de titulación "Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género *Epidendrum*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, Mayo de 2018

Christian Andrés Bermeo Criollo

0106557507



Cláusula de Propiedad Intelectual

Francisco Alberto Sari Cumbe, autor del trabajo de titulación "Simbiosis Hongo – Micorriza como factor promotor de la germinación en semillas de orquídeas del género *Epidendrum*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, Mayo de 2018

Francisco Alberto Sari Cumbe

0924207467



DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a Dios por darme vida y ser mi fortaleza para llegar a acabar mi carrera. A mis padres Milton y Enma, por el apoyo incondicional todos estos años y es por ellos que puedo seguir adelante en mi vida personal y profesional, a mi abuelo Miguel por ser la motivación que siempre necesita en todo aspecto de mi vida, a mi hermano por siempre estar a mi lado y ser mi compañía, y al resto de mi familia por confiar siempre en mí. **Christian**

Esta tesis se la dedico a Dios por haberme dado la vida, las fuerzas para superar todas mis adversidades. A mi abuela Rebeca (+) por sus rezos y oraciones para que no me pase nada malo y siga adelante, por los ánimos que me daba cada vez que me veía, por el entusiasmo que me transmitía para poder culminar con mis estudios universitarios. A mis padres Jaime y Romelia por el apoyo moral y económico, por las palabras de aliento para no rendirme en alcanzar mis metas. Me han dado y enseñado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis propósitos. A mi amada hija Avril por ser mi fuente de inspiración y motivación para poder ser cada día mejor como persona y como profesional y así lograr un futuro próspero. A mí querida esposa Johanna por estar a mi lado en los momentos buenos y malos, por su compañía en el transcurso de toda mi formación universitaria y no dejarme avanzar solo. **Francisco**



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por protegernos durante todo el camino y darnos fuerza para superar los obstáculos y dificultades a lo largo de nuestra vida. Agradecemos también la confianza y el apoyo brindado por nuestras familias. Agradecemos de manera muy especial a la Blga. María Elisa Durán López, MSc. por brindarnos su experiencia y asesoramiento a lo largo del desarrollo de la presente tesis. A la Dra. María Elena Cazar, PhD. por la cortesía y acogida que nos brindó, al ser guía en la realización de nuestra tesis. A la Dra. Raffaella Ansaloni, directora del Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca por habernos brindado las facilidades para permitirnos el trabajo en el laboratorio del Orquideario. A la Dra. Mónica Narváez por apoyarnos con sus conocimientos y experiencia dentro del laboratorio del Orquideario. Al Dr. Rodrigo Caroca Cáceres, PhD. por su intervención y recomendaciones. Al Dr. Geovany Larriva por su cordialidad al acceso de equipos y materiales de laboratorio. A nuestros profesores lo largo de la carrera por la formación académica impartida.

Christian y Francisco



INTRODUCCIÓN

Las orquídeas están consideradas por la CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres) como especies amenazadas y en peligro (Jiménez, 2014). Existen algunos factores que están contribuyendo a que muchas especies de orquídeas en la naturaleza estén desapareciendo, aunque, la mayor amenaza es la pérdida de su hábitat natural, ocasionada por actividades humanas; siendo la de mayor importancia la deforestación. En 2009 se estableció que la tasa de disminución de la superficie forestal en el Ecuador es de 1,7 % anual, y según el proyecto Evaluación Nacional Forestal del Ministerio del Ambiente tiene una tasa de deforestación de 70.000 hectáreas al año, contribuyendo a la pérdida de biodiversidad, debido a que no sólo se pierden orquídeas sino también miles de especies tanto vegetales, animales y hongos, entre otros (Ministerio del Ambiente, 2013; Cerna, Cárdenas, Cruz & Jácome, 2014; Jiménez, 2014).

Además de la deforestación existe dificultad en la germinación cuando las semillas de orquídeas se encuentran en su hábitat natural. Las semillas producidas por las orquídeas son pequeñas con un tamaño entre 1 a 5 mm y no tienen material necesario para su desarrollo inicial, terminando en la dependencia de fuentes externas de carbono (Guimarães Rodrigues et al., 2013). Se estima que de las numerosas semillas contenidas en una cápsula de orquídea solo el 2 al 3 % de semillas germinan estando estas en estado natural. Existe estratégicamente la relación simbiótica con hongos micorrízicos, en la que, después de la colonización, aumenta la superficie de absorción estableciendo un flujo de carbohidratos, minerales, vitaminas, hormonas y aminoácidos que contribuyen a la germinación de semillas y desarrollo de las plantas, mientras que el hongo se beneficia de los productos de fotosíntesis de la planta (Mayo, Cázares, de la Cruz & Flores, 2010).

La presente investigación forma parte del proyecto “*Estudio de la relación simbiótica orquídea – micorriza en la Provincia del Azuay, Ecuador*” (DIUC XIV-16), y cuyo propósito es evaluar el efecto de estos microorganismos sobre la germinación “in vitro” de las semillas de orquídeas del género *Epidendrum*, donde se pone a prueba dos hongos micorrízicos para la germinación simbiótica de la semilla, comparándola con la germinación no simbiótica, en procesos de micropropagación con el fin de demostrar el efecto benéfico de la micorrización como posible estrategia de propagación y conservación de orquídeas.



HIPÓTESIS

Los hongos micorrízicos *Ceratobasidium* sp. y *Sebacina vermifera* aislados del proyecto “*Estudio de la relación simbiótica orquídea – micorriza en la Provincia del Azuay, Ecuador*” (DIUC XIV-16), tienen el potencial de ser factores coadyuvantes en la germinación de semillas de orquídeas del género *Epidendrum*.

OBJETIVOS GENERAL Y ESPECIFICOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de los hongos micorrízicos *Ceratobasidium* sp. y *Sebacina vermifera* como promotores de la germinación de semillas de orquídeas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar un diseño experimental que compare la eficiencia de la tasa de germinación “in vitro” de semillas del género *Epidendrum*, en simbiosis con dos especies de hongos micorrízicos y un proceso estándar de germinación en laboratorio.
- Establecer una plataforma de germinación simbiótica de semillas de orquídea-hongos micorrízicos, a través de la evaluación de medios y condiciones de cultivo adecuadas.
- Establecer la importancia de la germinación “in vitro” como estrategia de propagación y conservación de orquídeas.



CAPÍTULO I

1 ORQUÍDEAS

1.1 GENERALIDADES

La familia *Orchidaceae* es uno de los grupos de gran diversidad de plantas alrededor del mundo con aproximadamente 35.000 especies y 800 géneros. Las orquídeas están distribuidas en todo el mundo principalmente, en la región tropical y su distribución exceptúa la Antártida (Lopez-Puc, 2013).

Existen varias formas de clasificar a las orquídeas, pero la mayoría de autores refieren una clasificación sistemática, tal como lo hacen Velasco & Beltrán (2008), donde, se clasifican en cinco subfamilias:

1. Apostasioideae
2. Cyripedioideae
3. Neottioideae
4. Orchidoideae
5. Epidendroideae

Además, en muchas veces se hace énfasis al hábitat de las orquídeas de las cuales casi el 80% de la familia *Orchidaceae* son epífitas, y el resto son terrestres y litófitas (Durán García & Méndez González, 2010).

Generalmente las orquídeas producen a lo largo del año miles de semillas, sin embargo, están hechas de una sola pieza o cotiledón; en cuanto a su forma varía desde filiformes o fusiforme y en ocasiones pueden formar protuberancias. El tamaño varía desde pocas micras hasta unos 5 milímetros, y su peso varía de 1 a 22 microgramos. Consta de una cubierta y un embrión, viéndose desprovista de endospermo (sirve para alimentar al embrión antes de la germinación). La testa o cubierta está formada por células muertas, y el embrión posee un rango de entre ocho a 200 células. Su dispersión se hace generalmente con ayuda del viento (Menchaca García, 2011).

Las semillas de esta familia tienen una gran dificultad en germinar ya que carecen de reservas y requieren una asociación simbiótica con hongos micorrízicos para su desarrollo (Ferreira Lopes, Smidt de Camargo & Ribas Fortes, 2015).



1.2 ORQUÍDEAS NATIVAS DE ECUADOR

En América, Colombia y Ecuador tienen una muy importante riqueza de orquídeas en el mundo con aproximadamente 9.000 especies, sin embargo, cerca de 3.000 se consideran en peligro de extinción. Afortunadamente existen programas de conservación que buscan concientizar y establecer un balance ecológico y social (Thomé Ortiz, Tejeda Sartorius, Téllez Velasco & Torres Rivera, 2017).

Específicamente en la flora de Ecuador la familia *Orchidaceae* es la más diversa con 4.016 especies de orquídeas registradas, de las cuales 1.318 especies (40%) son endémicas, representando el 33% de la diversidad de plantas en Ecuador, dando al país una gran diversidad de orquídeas relativo a su superficie (Mites, 2008).

Ecuador supera en número de especies endémicas a países como Colombia, Perú y Brasil; entre los géneros con el mayor número de especies endémicas destacan *Lepanthes*, *Pleurothallis*, *Stelis*, *Epidendrum* y *Masdevallia*; además, la mayoría especies endémicas son epífitas encontrándolas desde el nivel del mar hasta los 4.500 m.s.n.m. adicional a este hecho la mayoría de especies endémicas se encuentra en el rango altitudinal de 1.500 hasta 2.500 m.s.n.m. (Jiménez, 2014).

Las orquídeas ecuatorianas, se encuentran en los Apéndices I y II de la CITES, las especies nombradas en el Apéndice I son consideradas en peligro de extinción y su comercio es prohibido en el exterior, lo cual no afecta a cultivos producidos "in vitro". El resto de las especies están en el Apéndice II y son especies no consideradas en peligro de extinción, pero si sometidas al control estricto en su comercio (Cites, 2017).

La UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) estima que 1.455 especies de orquídeas ecuatorianas poseen algún tipo de amenaza, el 2% se encuentra en Peligro Crítico (CR), 11% en Peligro (EN) y la gran mayoría en estado Vulnerable (VU) (Endara & Jost, 2011; Jiménez, 2014).

1.3 EPIDENDRUM SECUNDUM JACQ.

El nombre *Epidendrum* deriva de las palabras griegas *Epi*: sobre y *Dendrom*: árbol. A pesar del significado del nombre no todos los *Epidendrum* son epífitos, muchos de ellos crecen sobre rocas o sobre el suelo (Portilla, Días & Salazar, 2007). En el caso de *Epidendrum* pueden ser epífita o terrestre y establecerse sobre cuevas empinadas de bosque húmedo tropical o bosque lluvioso (Dodson & Marmol de Dodson, 1989).

Epidendrum secundum, también llamada Flor de Cristo, posee un tallo en forma de caña que alcanza hasta 3 metros de altura (Bustos, 2007). También posee una inflorescencia apical, alargada con numerosas flores en el ápice color rojo, rosado,



blanco o amarillo; labio erecto, callo grande a menudo de color diferente al de otras partes florales y lóbulos de labios fimbriados (Dodson & Marmol de Dodson, 1989).



Figura 1. *Epidendrum secundum* del Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzaín.

Fotografía: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

2 HONGOS MICORRÍZICOS

2.1 GENERALIDADES

El género *Rhizoctonia* es definido por una serie de características, entre las cuales están: hifas gruesas (3 a 17 μm de diámetro), ramificación de las hifas en ángulos rectos (90°), presencia de un septo y una constricción primaria cercana al punto de ramificación (Sneh, Burpee & Ogoshi, 1991). Por norma general poseen cadenas de células infladas denominadas células monilioides (Otero, Ackerman & Bayman, 2004; Pereira, Megumi Kasuya, Borges & Fernandes de Araújo, 2005; Sneh et al., 1991). Al referirse a las estructuras sexuales estas son difícilmente apreciadas en medio de cultivo, es decir, “in vitro” (Filipello Marchisio, Berta, Fontana & Marzetti Mannina, 1985).

2.2 CLASIFICACIÓN DE MICORRIZAS

Existen varias clases de micorrizas entre las que se distinguen principalmente tres tipos:



- **Ectomicorrizas:** asociaciones con un manto de hifas que emite raíces laterales cortas (cistidios) y una red de Hartig de hifas más o menos laberíntica que penetran entre las células de la raíz, estas se dan en plantas generalmente leñosas (Martín, 2011).
- **Micorrizas arbusculares:** asociaciones de hifas formadas en las plantas que por lo general tienen arbuscúlos y con frecuencia tienen vesículas, también conocidos como micorrizas vesículo-arbusculares, estas se dan en plantas herbáceas y leñosas (Barriuso, Martín-Santafe & Solís, 2014).
- **Micorrizas de orquídeas:** asociaciones donde penetran dentro de las células de las orquídeas en bobinas de hifas (ovillos). Al darse en las orquídeas, las micorrizas generalmente son basidiomicetos en alianza con el género-forma *Rhizoctonia* (Barriuso et al., 2014)

Las micorrizas de orquídeas primariamente se pueden clasificar en base a estructuras asociadas con el estadio reproductivo sexual (teleomorfo), donde los géneros teleomorfos son: *Ceratobasidium*, *Tulasnella*, *Sebacina* y *Thanatephorus* (Mosquera-Espinosa, Bayman & Otero, 2010). Para la familia *Orchidaceae*, *Rhizoctonia* sp., no es considerado patógeno sino un hongo endófito. Las características de la ramificación, la anatomía de poro septal y la cantidad de núcleos por cada célula por lo general son criterios morfológicos para identificar al hongo aislado. (Ordoñez, 2012; Sneh et al., 1991).

Según el número de núcleos de las células de hifas en fase sexual pueden dividirse en uninucleadas, binucleadas o multinucleadas; de las cuales mayormente es binucleada y su teleomorfo es *Ceratobasidium* o *Tulasnella* (Sneh et al., 1991).

También a las micorrizas se la puede clasificar según la disposición de las hifas respecto a las células corticales de la planta (Harley & Smith, 1983; Siqueira & Franco, 1988; Fernández, Fontanela & Messutti, 2005), dividiéndose en:

- **Micorrizas ectotróficas:** el hongo no penetra en sus células, sino que se desarrolla entre las células corticales de la raíz.
- **Micorrizas endotróficas:** estructuras del hongo penetra en las células corticales de la orquídea hospedadora pero sin producirse algún cambio morfológico.

En el caso de identificación la observación macroscópica de las raíces es insuficiente para detectar la presencia de hongos micorrízicos. Hay que acudir a técnicas taxonómicas donde se basa en la observación de estructuras externas e internas, es



decir, basándose en su morfología, pero esto no permite la identificación precisa de las especies. Por ello, para identificar especies de micorrizas se usa caracterización molecular, que se basa en el análisis de secuencias nucleotídicas del DNA, que al amplificarse de manera discriminativa permiten obtener información muy confiable con respecto a la relación parental que exista entre grupos o poblaciones micorrízicas (Camarena-Gutiérrez, 2012).

3 GERMINACIÓN

3.1 FISIOLOGÍA

La germinación se refiere a los estadios secuenciales del proceso de desarrollo del protocormo hasta formar hojas y raíces. El primer paso en la germinación es el aumento de volumen de la semilla por imbibición, luego hay la ruptura de la testa por división celular, dando lugar a una estructura cónica o esférica llamada protocormo, y se forma en la región apical una protuberancia llamada primordio foliar. Posteriormente formará rizoides alrededor del protocormo, hojas fotosintéticas a partir del primordio foliar y en la parte basal del protocormo se forman raíces, formando así una planta completa (Rodríguez, 2013).

El protocormo enterrado de una orquídea no puede fabricar alimento, es indispensable que la relación orquídea-micorriza se conserve en los estadios tempranos del ciclo de vida de la orquídea (McKendrick, 2000; Vargas, 2012). En las células corticales dentro de la raíz de la planta, el hongo produce estructuras denominadas pelotones, de esta manera, posteriormente la hifa se convierte en una estructura desorganizada o masa irregular, que ayudará en la transferencia de nutrientes para facilitar su crecimiento (Ordóñez, Diez-Gomez, & Otero, 2012).

A pesar que las semillas de una cápsula de orquídea son numerosas (2 millones por capsula, aproximadamente), se considera que del 2 a 3% de semillas pueden germinar en condiciones naturales ya que las semillas disponen de escasa reserva para llevar a cabo su germinación, es por ello, que el desarrollo “in vitro” se plantea como una alternativa en la regeneración de plantas, ya que se realiza en condiciones controladas y asépticas (Mayo et al., 2010).

3.2 LA MICROPROPAGACIÓN

Es la propagación de plantas “in vitro” y es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Los cultivos se elaboran con componentes específicos (hormonas, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.) y condiciones ambientales establecidas como la temperatura, humedad y luz (Bello,



Moreno, Salgado, & Olivera, 2016; Rangel, 2014; Segretin, 2011; Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2017).

Según Menchaca García (2011), los factores que influyen en el desarrollo de órganos, tejidos y células de plantas “in vitro” son similares a los que limitan el crecimiento de plantas “in vivo”. Estos factores son:

- Carbohidratos y minerales
- Hormonas vegetales
- Radiación activa (luz)
- Temperatura
- pH del medio
- Humedad
- Intercambio de gas
- Presencia de microorganismos como hongos y bacterias.

3.3 FACTORES A CONSIDERAR PARA EL CULTIVO “IN VITRO” DE ORQUÍDEAS

Las orquídeas emplean un tiempo corto entre la maduración y la pérdida de vitalidad de la semilla. Las etapas antes del desarrollo de las hojas y los tejidos de almacenamiento, dependen de la humedad y los regímenes de temperatura apropiados y también de la sincronía de la germinación, el tiempo, y las condiciones ideales para el crecimiento; es así que todos estos factores resultan críticos para la germinación (Rasmussen et al., 2015).

En el concepto de mejorar el cultivo “in vitro” las condiciones a considerar es la optimización de los factores ambientales como la luz, ambiente gaseoso, temperatura y humedad considerando los siguientes aspectos:

- La composición gaseosa del cultivo “in vitro”, es diferente a la de “in vivo” por restricción al intercambio gaseoso (Figuerola, 2006; Hew & Yong, 2004).
- Las orquídeas necesitan condiciones de temperatura diurnas entre 13 a 32°C y temperaturas nocturnas de 10 a 21°C. Las orquídeas se pueden dividir en tres categorías: de clima frío, templado y cálido, pero la mayoría se desarrollan en ambientes tropicales, en el caso de cultivo “in vitro” se requiere un clima lo más parecido al de su procedencia (Bello et al., 2016; Rasmussen et al., 2015; Vargas, 2012).



- La humedad así como la temperatura del sustrato ofrecen señales estacionales que liberan de la latencia a la semilla y/o mejorar la germinación de la semilla (Rasmussen, Dixon, Jersákova & Tésitelová, 2015).
- Las orquídeas requieren la máxima cantidad de luz posible sin que esta cause lesión a la planta, aunque si la cantidad de radiación lumínica es alta, destruye la clorofila; por el contrario, poca luz impide o anula su desarrollo. En ambos casos se retarda el crecimiento y se reduce o evita la floración. (Gil, Bastida, Flores & Navarro, 2007). Por otra parte, muchas especies terrestres de orquídeas e incluso en algunas especies epífitas la luz inhibe la germinación (Rasmussen et al., 2015).

3.4 GERMINACIÓN SIMBIÓTICA

Las semillas de orquídeas carecen de endospermo, no pudiendo aprovechar sus reservas alimenticias, además, cuando las condiciones ambientales no resultan ser suficientes para su germinación, las semillas de orquídeas necesitan ser colonizadas por hongos, generalmente del género *Rhizoctonia*, entablando una relación simbiótica denominada simbiosis micorrízica, estableciéndose así un flujo de carbohidratos, minerales, vitaminas, hormonas y aminoácidos que contribuyen a la germinación, quedando rodeada la semilla de una densa red de hifas fúngicas (Bello et al., 2016; Velasco & Beltrán, 2008; Mathhei Jensen, Cisternas Báez, Calderón Baltierra & Álvarez Gerding, 2002).

Algunas orquídeas, por ejemplo las epífitas, son específicas en su interacción micorrízica, mientras otras pueden vincularse con distintos hongos micorrízicos, además la especificidad del hongo micorrízico por las orquídeas puede ser variable (Chávez, Mosquera-Espinosa, & Otero Ospina, 2014). Esto determina la complejidad de aislar al hongo micorrízico e identificar la especificidad con una especie de orquídea. Algunas plantas conservan dicha relación hasta su estado adulto (Mosquera-Espinosa et al., 2010; Zettler, Poulter & McDonald, 2007).

En la naturaleza, la colonización de las semillas con un hongo micorrízico es un requisito para que inicie la germinación, estos microorganismos proporcionan al embrión material orgánico y nutrientes minerales para acelerar su desarrollo (Otero Ospina & Bayman, 2009). Aunque las semillas están desprovistas de reservas de carbohidratos, el almidón se acumula tras la hidrolización de lípidos, proteínas y glicoproteínas. Tras la penetración del hongo en la semilla, hifas fúngicas se digieren proporcionando una fuente de carbohidratos exógenos al desarrollo de embriones (Kauth, 2005).



Es así que las orquídeas dependen de asociaciones con micorrizas para germinar, pero en muchas especies esta dependencia con estos microorganismos continúa en la edad adulta, donde la persistencia de los hongos correctos son necesarios para la supervivencia de las orquídeas (Newman, Ladd, Batty & Dixon, 2007).

4 MEDIOS PARA CULTIVO “IN VITRO” DE ORQUÍDEAS

La germinación “in vitro” de orquídeas ha evolucionado con el tiempo, utilizando así medios de cultivos básicos suplementados con componentes orgánicos (Salazar-Mercado & Cancino, 2012). Se conoce diferentes medios de cultivo para uso generalizado; sin embargo, los requerimientos pueden ser muy diversos, incluso en especies del mismo género (Mayo et. al, 2010).

Aunque son varios los medios de cultivo que se han desarrollado para la germinación simbiótica y asimbiótica de semillas de orquídeas “in vitro”, el uso de diferentes formulaciones de medios, con adición de sales minerales, hormonas, vitaminas o compuestos orgánicos, está dirigido a mejorar la germinación y el desarrollo “in vitro” embrionario de estas plántulas (Guimarães Rodrigues et al., 2013; Salazar-Mercado & Cancino, 2012).

Los componentes del medio de cultivo empleado puede variar de acuerdo a la especie de orquídea de la que se trate, por lo general, se utiliza el medio de Murashige & Skoog (MS) o modificaciones de éste (Abdelnour-Esquivel & Vincent Escalant, 1994). Es necesario un ambiente aséptico y una fuente de energía exógena (azúcar); además, se desarrollan en presencia de una alta humedad relativa (Salazar-Mercado & Cancino, 2012; Sandoval, Brenes & Perez-Sánchez, 1991).

El medio MS modificado coco, está constituido por carbón activado, azúcar, vitaminas y agua de coco y es usado en el cultivo “in vitro” de tejidos vegetales. Este medio ha sido probado en muchas especies de orquídeas, dando resultados muy buenos, ya que este medio de cultivo brinda un alto porcentaje de nitrógeno y potasio, necesarios para la nutrición de la planta (Pérez & Castañeda, 2016; Salazar-Mercado & Cancino, 2012; Sandoval, Brenes & Perez-Sánchez, 1991).

Con muy pocas excepciones, los métodos de germinación “in vitro” utilizan agar de harina de avena (OMA) como medio. Sin embargo, no se han investigado los efectos de las concentraciones de avena sobre la germinación simbiótica de las semillas de orquídeas (Otero Ospina & Bayman, 2009; Salazar-Mercado, 2012). Aunque para ciertas especies como *Dendrobium lindleyi* la germinación podría ser potenciada por



concentraciones elevadas de avena (Mala, Kuegkong, Sa-ngiaemsri & Nontachaiyapoom, 2017).



CAPÍTULO II

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDIO

Se utilizaron dos especies de hongos micorrízicos provistos por el Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzaín. Estos aislados fúngicos y su identificación molecular son el resultado del trabajo experimental realizado en etapas previas del proyecto “*Estudio de la relación simbiótica orquídea – micorriza en la Provincia del Azuay, Ecuador*” (DIUC XIV-16). Estos hongos micorrízicos corresponden a: *Ceratobasidium* sp. y *Sebacina vermifera*, ambos aislados de raíces de orquídeas terrestres, el primero fue colectado a partir de *Trichoceros anntenniferum* a una altura de 2.525 m.s.n.m. y el segundo de *Epidendrum* sp. a una altura de 3.090 m.s.n.m.

5.2 MÉTODOS

Para el presente estudio se emplearon métodos de colecta, procesamiento y siembra de semillas. El procesamiento previo a las pruebas de germinación simbiótica, incluyó procesos de colecta, análisis de viabilidad, desinfección y lavado de semillas.

Este proceso se desarrolló en condiciones de esterilidad, según la metodología propuesta por Seaton & Ramsay (2009). Para el cultivo simbiótico de semillas y observación de germinación se utilizó la metodología propuesta por Hoang, Kane, Radcliffe, Zettler & Richardson (2017). La documentación del proceso fue mediante fotografías y apuntes a lo largo de todo el estudio. El análisis de datos se realizó en hojas de cálculo del programa Microsoft Excel.

5.2.1 Colecta y procesamiento de las semillas de orquídea del género *Epidendrum*

Las semillas de *Epidendrum* fueron obtenidas a partir de cápsulas maduras, recolectadas en el Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca, Campus Balzaín; en los meses de noviembre y diciembre del 2017. Estas cápsulas debían presentar características tales como una coloración en tonos verdes y morados y tener una consistencia flexible al tacto. Una vez recolectadas, las cápsulas fueron envueltas en papel aluminio y almacenadas en refrigeración (4°C) en un periodo entre uno y siete días hasta su procesamiento (ver **Figura 2**).



Figura 2. Cápsulas maduras de *Epidendrum* recolectadas del Orquideario de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Cuenca, Campus Balzaín.

Fotografía: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

Como segundo paso del proceso, de cada cápsula se extrajo la mayor cantidad posible de semillas, de donde se tomó una submuestra para el análisis de viabilidad. La viabilidad de las semillas pudo comprobarse, al observar al microscopio con un aumento de 4X semillas con embriones esféricos y engrosados (ver **Figura 3**). Con este criterio, solo se seleccionó a las semillas que presentaron mayor porcentaje de viabilidad.



Figura 3. Semillas de *Epidendrum* viables y no viables.

Fotografía: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

Una vez confirmada la viabilidad, las semillas seleccionadas fueron pesadas en una balanza analítica BOECO sobre pedazos de papel filtro (1,5 cm x 2 cm), hasta alcanzar un peso cercano de 1,8 mg, equivalente a 200 semillas aproximadamente. Con el mismo papel filtro se realizaron sobres después del pesaje de tal modo que no se pierdan las semillas durante la desinfección y el lavado.

Para el proceso de desinfección se introdujo cada sobre, que contenía las semillas de *Epidendrum*, dentro de un tubo de ensayo y se vertió en cada tubo la solución



desinfectante (90 ml de agua estéril, 5 ml de etanol y 5 ml de hipoclorito), en cantidad suficiente para cubrir la totalidad del sobre. Luego de dejar reposar de cinco a 10 minutos se realizaron dos lavados con agua estéril.

5.2.2 Formulación de medios de cultivo para ensayos de germinación “in vitro”

Los medios de cultivo que se utilizaron son:

- a) Medio Oat Meal Agar (OMA), constituido por avena y Agar, es una fuente de carbohidratos complejos, lo que favorece la simbiosis.
- b) Murashige Skoog (MS) modificado de coco, constituido por carbón activado, azúcar, vitaminas y agua de coco.
- c) Medio Patata Dextrosa Agar (PDA), constituido por puré de papa, azúcar y agar.

Estos medios fueron formulados a partir de componentes puros, homogeneizados y autoclavados (ver **ANEXO A**).

5.2.3 Ensayos de Germinación “in vitro” en condiciones asimbióticas y simbióticas

Para evaluar el efecto de los hongos micorrízicos *Ceratobasidium* sp. y *Sebacina vermifera* en la germinación de semillas, se diseñó un ensayo, con cuatro tratamientos. El Tratamiento 1 generó condiciones de germinación en un medio nutritivo, actuando como control positivo. El Tratamiento 2 evaluó la germinación de semillas en un medio mínimo (Control Negativo). Los tratamientos T3 y T4 evaluaron el efecto de los hongos micorrízicos, crecidos en medio mínimo. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento (ver **Tabla 1**).

Tabla 1. Descripción de los tratamientos simbióticos y asimbióticos.

Tratamiento	Descripción
T1	Semillas de <i>Epidendrum</i> sembradas en medio MS modificado coco
T2	Semillas de <i>Epidendrum</i> sembradas en medio OMA
T3	Semillas de <i>Epidendrum</i> + <i>Sebacina vermifera</i> sembradas en medio OMA
T4	Semillas de <i>Epidendrum</i> + <i>Ceratobasidium</i> sp. Sembradas en medio OMA

Elaboración: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

En los tratamientos T1 y T2 al no incluir hongos micorrízicos (germinación asimbiótica) la siembra se realizó abriendo los sobres lavados y extendiéndolos sobre los medios de cultivo, distribuyendo las semillas por toda la superficie lo más uniformemente posible.



Para los tratamientos T3 y T4 previo a la siembra de las semillas, en cada una de las cajas Petri con medio, de manera individual se colocó un pedazo de agar con micelio fúngico obtenido de las colonias de los hongos micorrízicos previamente aislados en medio PDA, posteriormente se repitió el mismo proceso de los tratamientos T1 y T2, evitando tocar el hongo inoculado (germinación simbiótica).

El ensayo de germinación consiste en comparar la tasa de germinación de cuatro tratamientos. La germinación simbiótica fue evaluada en los medios OMA inoculados con los hongos micorrízicos y la germinación asimbiótica se evaluó en el medio MS modificado coco. Para cada tratamiento se utilizaron 10 cajas Petri con el medio indicado y con un peso de semillas aproximado de 1,8 mg.

5.2.4 Incubación de las cajas con cultivo simbiótico

Se colocó las cajas sembradas con cultivo simbiótico aproximadamente siete días en la cámara de flujo a una temperatura de entre 18 a 23°C, luego se trasladaron a un lugar oscuro por un periodo de siete días y finalmente se las pasó a un lugar iluminado.

5.2.5 Conservación

Conservación de los hongos micorrízicos: Los hongos micorrízicos utilizados en los tratamientos simbióticos, van envejeciendo y es necesario conservarlos, y así evitar su pérdida, para esto se inoculó una cantidad del hongo proveniente de una cepa anteriormente aislada en medio PDA y luego se las incubaron en la estufa a temperatura controlada de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Conservación de las semillas: Las semillas sobrantes después de las siembras fueron envueltas en papel aluminio y almacenadas en refrigeración (4°C) en caso de no conseguir semillas para un próximo ensayo.

5.2.6 Análisis de la germinación

Para realizar una mejor observación a cada caja en la parte posterior se le trazó una cuadrícula con una superficie de $2,25\text{ cm}^2$ (1,5cm x 1,5cm) (ver **Figura 4**).



Figura 4. Diseño de cuadrícula dibujada al reverso de las cajas sembradas.

Fotografía: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

Se consideró cinco estadios de desarrollo, basadas en una modificación de la metodología de Stewart & Zettler (2002), dándole un valor de 0 a 5 de acuerdo a su estadio (ver **Tabla 2** y **Figura 5**).

Tabla 2. Estadios de desarrollo, basadas en una modificación de la metodología de Zettler & Hofer (1998).

Estadio	Características
0	Sin germinación
1	Producción de rizoide(s) desde embrión según lo indicado por la flecha
2	Ruptura de la testa ampliando el embrión
3	Aparición del brote (protomeristema) como se indica mediante la flecha
4	Aparición de la hoja desde la región del brote indicada por flecha
5	Elongación de la hoja

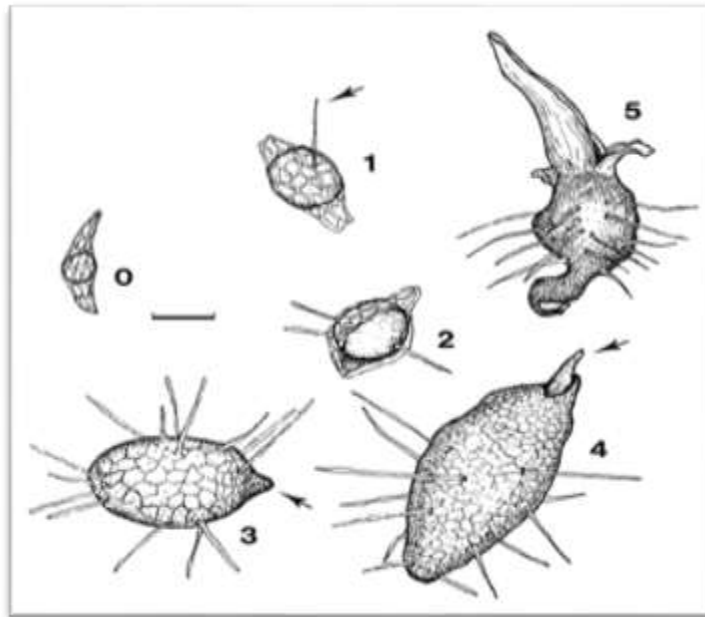


Figura 5. Estadios de germinación de orquídeas.

Fuente: Stewart & Zettler (2002).

La germinación de las semillas y el desarrollo de protocormos se evaluaron a los 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 60 días de la siembra. Debido a que en ensayos preliminares se pudo observar que había cambios en intervalos de 5, 10 y 20 días. Se estableció un límite de 60 días ya que en este tiempo se observó en los ensayos previos que ya se presentaba el estadio 5 (E5) con los tratamientos T3 y T4.

En cada repetición de cada tratamiento se contabilizaron el número total de semillas viables y a su vez, de estas semillas viables se registró el estadio alcanzado en los intervalos de días ya determinados. Para la observación de los diferentes estadios de germinación en los cuatro tratamientos se utilizó un microscopio óptico con la lente de aumento de 4x y un estereoscópico Nikon. También se registró los días de aparición de cada estadio de cada ensayo.

5.2.7 Medición de la altura alcanzada por las plántulas en estadio 5 a los 60 días de la siembra

La altura de las plántulas se midieron a los 60 días de la siembra, ya que en este tiempo se pudo observar el estadio 5 (E5) con los tratamientos T3 y T4; esto se efectuó dentro de la cámara de flujo empleando cajas Petri y hojas papel milimetrado; y extrayendo las plántulas y colocándolas a un mismo nivel sobre la hoja milimetrada (ver **Figura 6**).



Figura 6. Medición de la altura alcanzada por las plántulas en estadio 5.

Fotografía: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

5.2.8 Estimación del porcentaje de germinación de semillas

El porcentaje de germinación de la semilla se estimó dividiendo el número de semillas contadas que habían germinado (a cada estadio se le asignó una puntuación de 0 a 5) por el número total de semillas viables sembradas.

El índice de Crecimiento (IG) de los protocormos se calculó usando la siguiente fórmula modificada a partir de Spoerl (1948):

$$IG = \frac{(N1 + N2 * 2 + N3 * 3 + N4 * 4 + N5 * 5)}{(N0 + N1 + N2 + N3 + N4 + N5)}$$

Donde IG es el índice de crecimiento; y N0 es el número de semillas en el estadio 0, N1 es el número de semillas en el estadio 1, y así sucesivamente (Spoerl, 1948; Otero et al., 2004; Otero Ospina, Ackerman & Bayman, 2005; Guimarães Rodrigues et al., 2013).

Con los datos obtenidos, correspondientes al número total de semillas viables y al número de semillas viables que alcanzaron los estadios 1, 2, 3, 4 y 5 en cada periodo de tiempo establecido; se calculó el porcentaje de los distintos estadios de germinación y el índice de crecimiento de los protocormos a los 30 y 60 días debido a que en estos días se puede hacer una comparación más uniforme con respecto a la aparición de los estadios.

También se calculó el porcentaje de las plántulas que llegaron a un tamaño comprendido entre 4 mm y la altura máxima correspondiente a 20 mm que se observó.



6 RESULTADOS

6.1 DISEÑO DE ENSAYO DE GERMINACIÓN “IN VITRO” EN CONDICIONES SIMBIÓTICAS Y ASIMBIÓTICAS

De los tres ensayos realizados se prepararon 120 cajas Petri sembradas, correspondiendo 40 a cada ensayo y de estas 10 por cada tratamiento. A continuación, se presentan los resultados de los tratamientos para cada ensayo, expresados como número de semillas viables (ver **Tabla 3**).

Tabla 3. Detalle da las cajas sembradas en los tres ensayos.

Ensayo	Tratamiento	Semillas totales	Semillas viables (%)	Semillas no viables (%)	Peso de semillas sembradas
1	T1	1404	44,7	55,3	1,8 - 2,1 mg
	T2	1382	44,2	55,8	
	T3	1156	49,4	50,6	
	T4	1706	54,1	45,9	
2	T1	880	74,0	26,0	1,8 - 2,1 mg
	T2	918	74,8	25,2	
	T3	972	79,2	20,8	
	T4	946	77,4	22,7	
3	T1	1194	64,1	35,9	2,5 - 2,8 mg
	T2	1391	70,1	29,9	
	T3	2178	93,4	6,6	
	T4	1682	83,8	16,2	

Elaboración: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

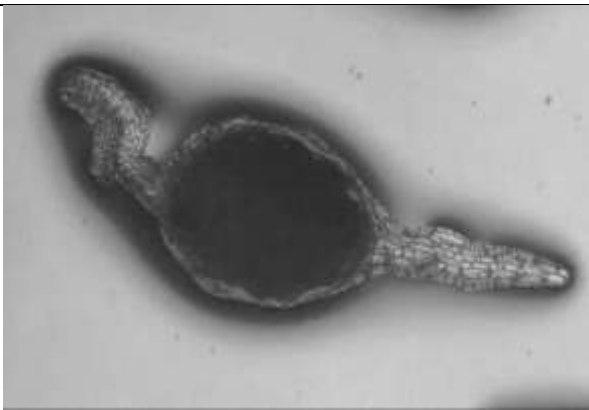


Los resultados son expresados como número total de semillas inoculadas y de estos porcentajes de semillas viables y no viables, en relación al recuento de semillas al inicio del ensayo. Además, se establecieron rangos de peso de las semillas que se mantuvieron cercanos a 2 mg. La conservación de las semillas, antes de la siembra se realizó en refrigeración en un tiempo de hasta siete días, y la germinación se mantuvo en oscuridad, hasta un tiempo máximo de 16 días.




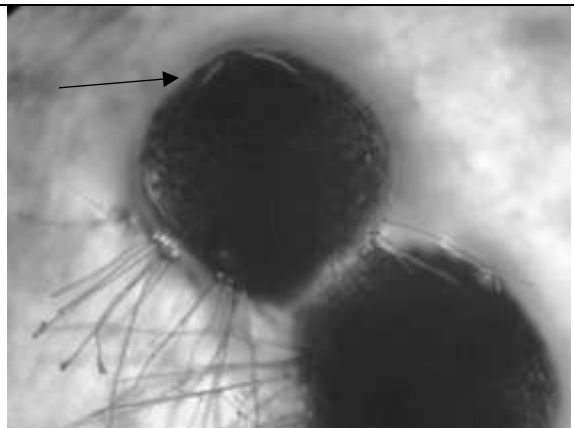

6.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE GERMINACIÓN

A nivel microscópico y macroscópico se pudo apreciar estructuras morfológicas semejantes a las descritas por Zettler & Hofer (1998) para realizar el respectivo análisis de los estadios de germinación de *Epidendrum*, como se ve a continuación:

Tabla 4. Detalle de estructuras morfológicas de semillas de *Epidendrum*, en cada estadio de germinación.

Estadio	Características	Foto
0	Sin germinación	
1	Producción de rizoide(s) desde embrión según lo indicado por la flecha	
2	Ruptura de la testa ampliando el embrión	



3	Aparición del brote (protomeristema)	
4	Aparición de la hoja desde la región del brote indicada por flecha	
5	Elongación de la hoja indicada por flecha	

Elaboración: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

6.3 EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA GERMINACIÓN CON RESPECTO AL TIEMPO

Como se describe a continuación se evaluó de forma cualitativa la evolución de la germinación de cada tratamiento en los periodos de tiempo planteados:



Tabla 5. Germinación según los días de inspección.

Ensayo	Tratamiento	Día 5	Día 10	Día 15	Día 20	Día 30	Día 40	Día 60
1	T1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	T2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	T3	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(+++)
	T4	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+++)
2	T1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	T2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	T3	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(+++)
	T4	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+++)
3	T1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	T2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	T3	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(+++)
	T4	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(+++)

Descripción: (-) sin germinación, (+) aparición del estadio 1 (E1) y 2 (E2), (++) aparición del estadio 3 (E3) y 4 (E4), (+++) aparición del estadio 5 (E5). **Elaboración:** Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

6.4 DÍAS DE APARICIÓN DE LOS ESTADIOS DE LAS SEMILLAS

Conforme a la revisión periódica establecida se pudo observar la aparición de los diferentes estadios de germinación en los tratamientos empleados (ver **Tabla 6**).

Tabla 6. Días de aparición de los 5 estadios de los tres ensayos.

ENSAYO	TRATAMIENTO	ESTADIOS				
		1	2	3	4	5
		Días de aparición				
1	T2	4	62	-	-	-
	T3	4	18	26	39	42
	T4	4	9	14	22	34
2	T2	4	0	-	-	-
	T3	4	19	28	38	50
	T4	4	10	16	25	30
3	T2	4	42	-	-	-
	T3	4	19	27	39	50
	T4	4	10	16	25	35

Elaboración: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.



Estos datos fueron recopilados según aparecían los 5 estadios de germinación de los distintos tratamientos.

6.5 COMPARACIÓN DE GERMINACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS SIMBIÓTICOS

Según el monitoreo en los intervalos de tiempo establecidos se observó la aparición de los diferentes estadios de germinación con los tratamientos T3 y T4, obteniéndose los siguientes gráficos comparativos:

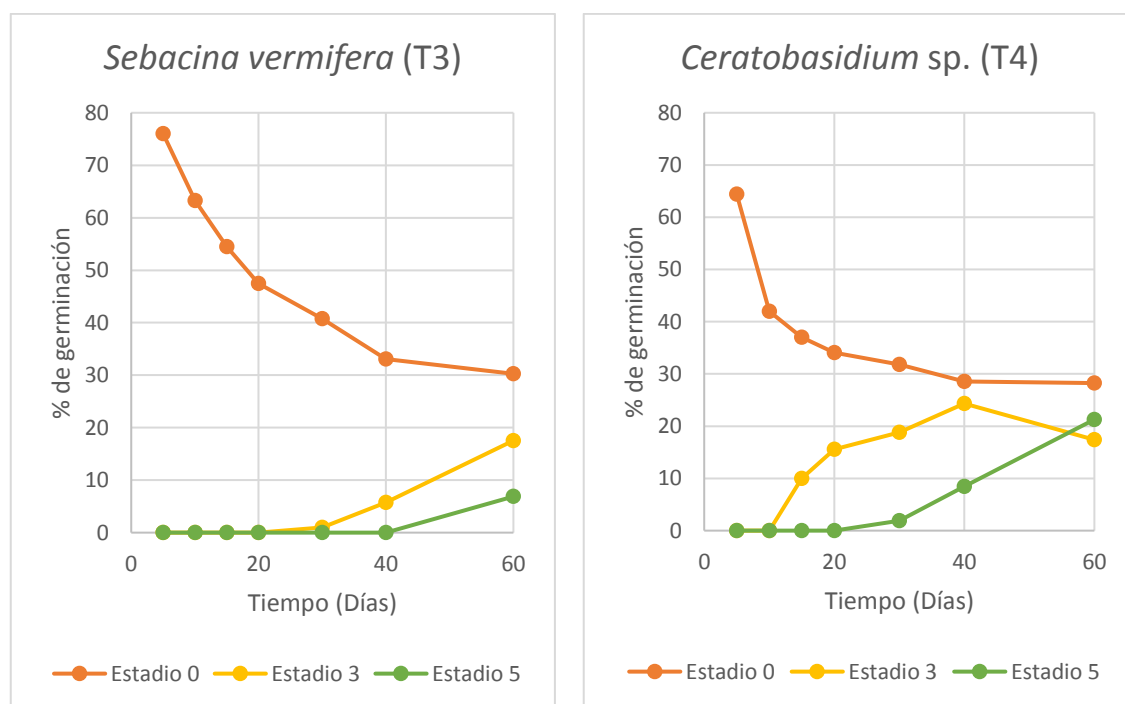


Gráfico 1. Comparación de eficiencia como promotor de germinación entre *Ceratobasidium sp.* y *Sebacina vermifera*.

Elaboración: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

6.6 PORCENTAJES DE GERMINACIÓN DE TRATAMIENTOS SIMBIÓTICOS VS. ASIMBIÓTICOS

Después de los 60 días del estudio se observó la tendencia en la germinación con respecto al estadio 0 en tratamientos simbióticos en contraste con tratamientos asimbióticos, esto se aprecia a continuación:

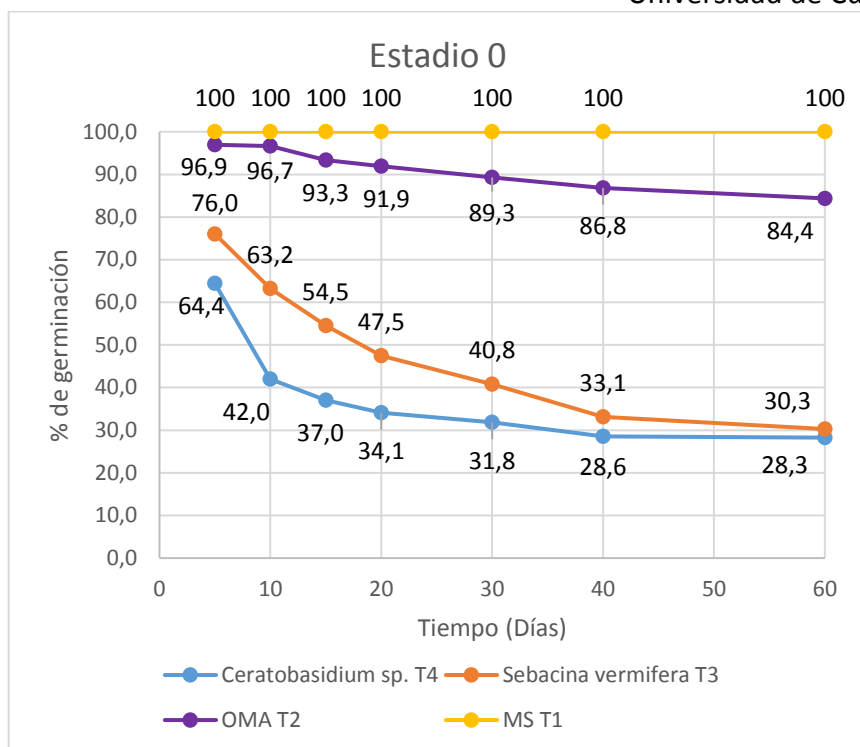


Gráfico 2. Comparación de eficiencia de germinación de tratamientos vs. Controles.

Elaboración: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

6.7 ÍNDICE DE CRECIMIENTO (IG)

A continuación se muestran los índices de crecimiento calculados a partir de los porcentajes de germinación según la fórmula descrita:

Tabla 7. Índice de germinación (IG).

Tratamiento	IG a los 30 días	IG a los 60 días
T1	0,0	0,0
T2	0,2	0,3
T3	1,0	2,8
T4	2,1	3,4

Elaboración: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

El índice de germinación se obtuvo de los datos correspondientes a la mitad y el fin del periodo establecidos tal como lo plantean Guimarães Rodrigues et al., (2013). El IG de T4 es mayor con respecto a los demás tratamientos siendo de esta manera más eficiente.



6.8 ALTURA ALCANZADA POR LAS PLÁNTULAS EN ESTADIO 5 (E5)

Esta medición se aplicó solo para los tratamientos simbióticos debido a que presentaron el estadio más avanzado de germinación obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 8. Altura alcanzada por las plántulas en Estadio 5 a los 60 días.

Ensayo y tratamiento	Alturas			
	<4 mm – 8 mm	9 mm – 14 mm	15 mm – 20 mm	Total
Ensayo 1 – T3	107 (100,0%)	-	-	107
Ensayo 1 – T4	278 (76,6%)	83 (22,9%)	2 (0,6%)	363
Ensayo 2 – T3	136 (99,3%)	1 (0,7%)	-	137
Ensayo 2 – T4	338 (82,4%)	72 (17,6%)	-	410
Ensayo 3 – T3	153 (100,0%)	-	-	153
Ensayo 3 – T4	824 (92,1%)	71 (7,9%)	-	895

Elaboración: Christian Bermeo C. y Francisco Sari C.

En los tres ensayos el mayor porcentaje de plántulas tuvo una altura comprendida entre 4 a 8 mm, mientras que en el primer ensayo se obtuvo la altura máxima de 20 mm.

6.9 MICRO CULTIVO DE LOS HONGOS MICORRÍZICOS EMPLEADOS

A nivel microscópico se observó las características más importantes de los dos hongos micorrízicos empleados, correspondientes a *Rhizoctonia*. Estas características fueron: hifas gruesas, ramificación de las hifas en ángulos de 90° y un septo cercano al punto de ramificación (ver **ANEXO F**).



CAPÍTULO III

7 DISCUSIÓN

7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR EFICIENCIA DE GERMINACIÓN EN CONDICIONES SIMBIÓTICAS Y ASIMBIÓTICAS

En el presente estudio se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento, cada una bajo las mismas condiciones de trabajo, obteniéndose valores representativos en cuanto al número total de semillas inoculadas y el porcentaje de semillas viables. El periodo de evaluación fue de 60 días usando métodos simbióticos y asimbióticos para una posterior comparación y análisis de estos métodos empleados.

De manera similar, en un estudio con semillas de *Cyrtopodium glutiniferum* se evaluó la germinación simbiótica en medio OMA con la inoculación del hongo micorrízico *Epulorhiza* sp. y el análisis de tratamientos asimbióticos en medio MS y KC por 70 días, así también, en otra investigación realizada con semillas de *Dendrophylax lindenii* se estudió la germinación simbiótica usando medio OMA, ambas investigaciones dieron resultados reproducibles que permitieron evaluar la germinación de estas especies de orquídeas (Guimarães Rodrigues et al., 2013).

El diseño del ensayo tiene el fin de analizar la eficiencia de germinación en condiciones simbióticas y asimbióticas, permite evaluar la germinación simbiótica semilla – hongo micorrízico en condiciones experimentales, con una adecuada reproductibilidad, lo cual conduce a la obtención de resultados representativos.

7.2 MORFOLOGÍA DE SEMILLAS DEL GÉNERO *EPIDENDRUM* EN PROCESO DE GERMINACIÓN

Los diferentes estadios de germinación fueron observados e identificados con claridad debido a que presentaron las características morfológicas descritas por Stewart & Zettler (2002). La morfología se asemeja a las características documentadas en un estudio de *Dendrophylax lindenii* realizado por Hoang et al., (2017), en presencia de dos cepas de *Ceratobasidium* (ver **Tabla 4**).

7.3 EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN CON RESPECTO AL TIEMPO

Con los resultados cualitativos se pudo evidenciar que los tratamientos simbióticos T3 y T4 fueron más efectivos desde el día 15 hasta el día 60, en comparación con los tratamientos asimbióticos. Además, dentro de los 60 días en el tratamiento asimbiótico que usó medio MS no se visualizó el crecimiento. Para el tratamiento con medio OMA el porcentaje de germinación fue muy bajo ya que solo algunas semillas germinaron hasta el estado estadio 2 (E2) (ver **ANEXO C y D**).



En la evaluación de la morfología de la germinación de semillas, los 5 estadios aparecieron únicamente en los tratamientos simbióticos, demostrando que el consorcio con hongos micorrízicos acelera la germinación, en comparación con las condiciones asimbióticas (ver **ANEXO B**). También se puede observar que *Ceratobasidium* sp. hace aparecer mucho más rápido los distintos estadios en comparación con la *Sebacina vermifera* (ver **ANEXO C, D y E**). Siendo estos resultados de morfología y días de aparición semejantes a lo que se reporta en el estudio de *Dendrophylax lindenii* de Hoang et al., (2017), a los 5, 10, 15, 20, 30, 40 y 60 días de revisión.

7.4 COMPARACIÓN DE GERMINACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS SIMBIÓTICOS

Según Zettler et al. (2007), la eficacia de la asociación simbiótica puede variar para aislados fúngicos de una misma especie, género o géneros diferentes. Algunas especies de orquídeas solo germinan en presencia de su simbionte fúngico (Pereira et al., 2005). Otros pueden germinar en asociación con hongos obtenidos de otras especies de orquídeas (Zettler, 1997).

En el estudio realizado por Otero et al., (2005), se aisló nueve hongos micorrízicos correspondientes al género *Ceratobasidium*, que variaron significativamente en su capacidad para inducir la germinación de las semillas de *Tolumnia variegata*, especie de orquídea de la cual se obtuvo los aislados fúngicos.

Según los resultados obtenidos en el estudio de germinación con *Dendrophylax lindenii* en el cual Hoang et al., (2017), emplearon dos cepas del mismo género, correspondiente a *Ceratobasidium*, demostrando que una cepa tuvo mejor resultados en cuanto a germinación con respecto a la otra cepa.

Esta variación en la inducción de germinación se pudo evidenciar en el presente trabajo ya que los resultados demuestran esta diferencia con los dos hongos empleados, siendo estos efectivos a los 60 días, destacándose el *Ceratobasidium* sp. en porcentaje y velocidad de germinación en semillas de *Epidendrum* (ver **ANEXO G, H, I, J**). Además de observar la efectividad de los dos hongos micorrízicos empleados, se puede evidenciar como el porcentaje del estadio 5 obtenido por el *Ceratobasidium* sp. es superior que lo alcanzado por la *Sebacina vermifera* (Carrasco-Hernández et al., 2011; Salazar-Mercado & Cancino, 2012).

Aislados fúngicos obtenidos de la misma especie de orquídea y morfológicamente iguales pueden tener diferentes porcentajes de germinación y desarrollo de protocormos cuando se inoculan conjuntamente con las semillas (Pereira, Torres, Guimaraes, Pereira & Kasuya, 2011). En este estudio se evidenció que no existe una



especificidad absoluta entre la orquídea y el simbionte fúngico, ya que *Ceratobasidium* sp. aislado de *Trichoceros anntenniferum* fue más eficaz con el género *Epidendrum* en comparación con *Sebacina vermifera* aislada a partir de *Epidendrum* sp.

Para la utilización de hongos micorrízicos en la producción simbiótica de plántulas, es importante probar la eficacia del hongo para promover la germinación y el desarrollo de las plántulas (Cabello & Camelio, 1996; Rasmussen, 2002; Stewart & Kane, 2006).

7.5 GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO EN TRATAMIENTOS SIMBIÓTICOS VS. ASIMBIÓTICOS

Las semillas de orquídeas presentan mucha dificultad para germinar, confirmando la necesidad de una asociación con un hongo micorrízico compatible a partir del cual se obtienen moléculas de carbono simples, como triosas y hexosas. Esta asociación es necesaria porque las reservas de lípidos y proteínas del embrión no son suficientes para permitir el comienzo de su desarrollo (Peterson, Massicotte & Melville, 2004).

Teniendo en cuenta que el medio OMA utilizado en el método simbiótico es pobre en nutrientes a comparación del medio MS, el desarrollo de semillas en este medio indica la importancia de los hongos micorrízicos en la germinación y el desarrollo de las orquídeas (Cabello & Camelio, 1996; Carrasco-Hernández et al., 2011; Guimarães Rodrigues et al., 2013). En cambio, dentro de los tratamientos asimbióticos, siendo el medio MS el control positivo, este no presentó germinación, por el contrario, el control negativo tuvo un desarrollo de las semillas hasta el estadio 2 (ver **ANEXO G**). Confirmando de esta manera que los requerimientos de los diferentes componentes para una mejor germinación varían según la especie de orquídea que se trate (Mayo et. al, 2010), de igual forma como reporta Mala et. al, (2017), donde concentraciones elevadas de avena potenciaron la germinación de *Dendrobium lindleyi*.

Los índices obtenidos en los tratamientos simbióticos fueron notablemente superiores a los obtenidos con los medios asimbióticos. Los índices de *Ceratobasidium* sp. de 2,1 y 3,4 y *Sebacina* v. de 1,0 y 2,8 a los 30 y 60 días respectivamente, son altos al compararlos con los índices obtenidos en el estudio con semillas de *Cyrtodium glutiniferum* realizado por Guimarães Rodrigues et al., (2013), que reportan valores de IG de 1,0 a los 35 días y 1,8 a los 70 días, en presencia del hongo *Epulorhiza* sp. En los tres ensayos se pudo observar que el IG obtenido por los hongos micorrízicos fue sumamente superior al IG alcanzado sin su empleo, con una superioridad para *Ceratobasidium*. Teniendo en cuenta que el índice de crecimiento puede solamente alcanzar un valor máximo de 5.



Con el tratamiento T4 se observó en el primer ensayo una plántula de 20 mm como máxima altura alcanzada, y alturas comprendidas entre 4 mm y 17 mm, mostrando mayores porcentajes entre los 4, 5 y 9 mm; en el segundo ensayo la altura máxima alcanzada fue de 13 mm seguida por alturas de 4, 5, 6, 7 y 8 mm con más porcentaje; y en el tercer ensayo al igual que en el segundo ensayo la altura máxima alcanzada fue de 13 mm, acompañada con un alto porcentaje entre las alturas de 4, 5 y 6 mm.

Con el tratamiento T3 se observó en el primer ensayo plántulas de altura comprendida entre 4 y 8 mm, observándose mayor porcentaje en las plántulas de 4 y 5 mm; mientras que en el tercer ensayo las plántulas tenían altura comprendida entre 4 y 6 mm, donde hubo mayor porcentaje en la altura de 4 mm en ambos ensayos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio revelan la gran importancia de una asociación simbiótica en la germinación de orquídeas como posible estrategia para propagación y conservación de especies vulnerables, es decir, estos resultados dan una pauta para futuras investigaciones para evaluar el potencial simbiótico en otras especies de orquídeas.



8 CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo de investigación permite establecer las siguientes conclusiones:

- El tiempo de germinación fue más eficiente al implementar métodos simbióticos con hongos micorrízicos en comparación con métodos asimbióticos, presentando los estadios más avanzados de germinación en un periodo más corto de tiempo.
- Los hongos micorrízicos *Ceratobasidium* sp. y *Sebacina vermifera* demostraron tener la capacidad de coadyuvar en la germinación de semillas de orquídeas del género *Epidendrum*.
- El tratamiento simbiótico con *Ceratobasidium* sp. presentó mejor desarrollo de la germinación en el tiempo que duró cada ensayo, en comparación con el tratamiento con *Sebacina vermifera*.
- Al demostrar que los hongos micorrízicos potencian la germinación de semillas de orquídeas del género *Epidendrum*, es adecuado proponer a estos microorganismos como parte de una estrategia de conservación de géneros de orquídeas amenazados por disminuciones en sus poblaciones.



9 RECOMENDACIONES

- Realizar este estudio con otras especies de orquídeas, y más aún si están bajo amenaza de extinción, y así probar la variabilidad de la eficiencia de la simbiosis hongo-micorriza con los hongos empleados en el presente trabajo.
- Para estudios posteriores se debería estudiar la viabilidad de las semillas de orquídeas después de ciertos periodos de almacenamiento a temperaturas de refrigeración.
- Para futuras investigaciones se debería estudiar la influencia de la nutrición inducida por parte del hongo micorrízico con relación al desarrollo de las raíces.
- Estudiar la influencia del fotoperiodo en la germinación simbiótica “in vitro” de orquídeas.
- Realizar estudios de germinación simbiótica “ex situ” utilizando sustratos orgánicos como alternativa de propagación de especies de orquídeas.



10 BIBLIOGRAFÍA

- Abdelnour-Esquivel, A. & Vincent Escalant, J. (1994). *Conceptos Basicos Del Cultivo de Tejidos Vegetales*.
- Barba, A. A., Luna, R. S. y Romero, A. J. (2002). Orquideología Básica. Biotemas. U.I.B.V.FES. Zaragoza.
- Barriuso Juan J., Martín-Santafé María, Solís Karina, S. S. (2014). Las micorrizas en los sistemas agro-forestales. *Agricultura*, (January), 618–622.
- Bello, C., Moreno, J., Salgado, M., & Olivera, A. (2016). *Rescate por germinacion in vitro*. Chiapas.
- Bustos, T. (2007). *Ecuador: Patria de Orquídeas (Loja y Zamora Chinchipe)*. Loja: Universidad Técnica Particular de Loja.
- Cabello, A., & Camelio, M. E. (1996). Germinación de semillas de maitén (*Maytenus boaria*) y producción de plantas en vivero. Universidad de Chile. *Revistas Ciencias Forestales*, 11 (1-2), 3–17.
- Camarena-Gutiérrez, G. (2012). Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. *Revista Chapingo*, 18(3), 409-421.
- Carrasco-Hernández, V., Pérez-moreno, J., Espinosa-Hernández, V., Almaraz-Suárez, J. J., Quintero-Lizaola, R., & Torres-Aquino, M. (2011). Contenido de nutrientes e inoculación con hongos ectomicorrízicos comestibles en dos pinos neotropicales. *Revista Chilena de Historia Natural*, 84(1), 83–96. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2011000100006>
- Cerna, M., Cárdenas, S., Cruz, A. & Jàcome, I. (2014). Colección de Germoplasma de Especies de la Familia *Orchidaceae* del Cantón Santiago de Méndez - MoronaSantiago, Ecuador. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 20(2), 5-19.
- Chávez, H. K., Mosquera-Espinosa, A. T., & Otero Ospina, J. T. (2014). Propagación in vitro de semillas de la orquídea *Comparettia falcata* Poepp. & Endl. (*Orchidaceae*) mediante técnicas simbióticas y asimbióticas. *Acta Agronomica*, 64(2). <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.42976>
- Cites. (2017). *Convención sobre el comercio internacional de especies*. Obtenido de <https://cites.org/sites/default/files/notif/S-Notif-2016-068-A.pdf>



- Dodson, C. H. & Marmol de Dodson, P. (1989). *Icones Plantarum Tropicarum Orchids of Ecuador*. Florida, EEUU: Marie Selby Botanical Gardens.
- Durán García, R. & Méndez González, M. E. (2010). *Biodiversidad y Desarrollo Humano en Yucatán* (Primera ed.). México: CICY, PPD-FMAM, CONABIO, SEDUMA.
- Endara L. & Jost L. (2010). *Orchidaceae*. Libro Rojo de las plantas endémicas del Ecuador. Segunda Edición. Publicación del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Ferreira Lopes, D., Smidt de Camargo, E. & Ribas Fortes, L. L. (2015). Efficient micropropagation of *Epidendrum secundum* Jacq. from leaves and protocorms. *African Journal of Biotechnology*, 14(13), 1122-1128.
- Figuerola, N. (2003). *Efecto del uso de la preaclimatación de las plantas in vitro de violeta africana (Saintpaulia ionantha wendl.) Preaclimatación in vitro de plantas de "violeta africana" (Saintpaulia ionantha H. Wendl.) y su efecto sobre aclimatación*. Universidad Católica de Valparaíso. Retrieved from http://ucv.altavoz.net/prontus_unidacad/site/artic/20061214/asocfile/20061214162241/figuerola_norma.pdf
- Filipello Marchisio, V., Berta, G., Fontana, A. & Marzetti Mannina, F. (1985). Endophytes of wild orchids native to Italy: their morphology, caryology, ultrastructure and cytochemical characterization. *New Phytologist*, 100(4), 623-641.
- Gil, I. V., Bastida, A. T., Flores, G. E. & Navarro, E. L. (2007). *Reproducción y manejo de orquídeas Mexicanas*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 31-42.
- Guimarães Rodrigues, F. A., Pereira Corrêa, M., Felício da Silva, C., Torres Pereira, D., Oliveira Feliciano, S., Veloso Reis, T. G. & Kasuya Megumi, M. C. (2013). Symbiotic propagation of seedlings of *Cyrtopodium glutiniferum* Raddi (Orchidaceae). *Acta Botanica Brasílica*, 27(3), 590-596.
- Harley, J. L. & Smith, S. E. (1983). *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press.
- Hew, C. S. & Yong, J. W. (2004). *The Physiology of Tropical Orchids in Relation to the Industry* (Segunda ed.). Singapur: World Scientific.



- Hoang, N. H., Kane, M. E., Radcliffe, E. N., Zettler, L. W. & Richardson, L. W. (2017). Comparative seed germination and seedling development of the ghost orchid, *Dendrophylax lindenii* (Orchidaceae), and molecular identification of its mycorrhizal fungus from South Florida. *Annals of Botany*, 119(3), 379-393. <http://doi.org/10.1093/aob/mcw220>
- Jiménez, M. (2014). Orquídeas del Ecuador-Número de especies , endemismo , especies amenazadas y su manejo adecuado. *Actualidad*, (October), 1–3.
- Kauth, P.J. (2005). *In vitro* seed germination and seedling development of *Calopogon tuberosus* and *Sacoila lanceolata* var. *lanceolata*: two Florida native terrestrial orchids. MS thesis, Environmental Horticulture Department, University of Florida.
- Lopez-Puc, G. (2013). An effective in vitro slow growth protocol for conservation of the orchid. *Epidendrum chlorocorymbos* SCHLTR. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16(1), 61-68.
- Mala, B., Kuegkong, K., Sa-ngiaemsri, N. & Nontachaiyapoom, S. (2017). Effect of germination media on in vitro symbiotic seed germination of three *Dendrobium* orchids. *South African Journal of Botany*, 112, 521-526.
- Martín Amor, A. (2011). Efectos de la inoculación del hongo de micorrización *Tuber melanosporum* y la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* en la calidad de *Pinus halepensis*. *Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Forestal*.
- Mathhei Jensen, E., Cisternas Báez, M., Calderón Baltierra, X. & Álvarez Gerding, X. (25 de Marzo de 2002). *Biblioteca Digital FIA*. Obtenido de Curso de Técnicas especializadas de conservación de orquídeas y congreso Internacional de conservación de orquídeas: <http://bibliotecadigital.fia.cl/handle/20.500.11944/144843>
- Mayo, A., Cázares, J., de la Cruz, E., & Flores, A. (2010). *Germinación in vitro de Semillas y Desarrollo de Plántulas de Orquídeas Silvestres de Tabasco*. *Revista de Ciencias de la Vida* (Vol. 20).
- Menchaca García, R. (2011). *Manual para la propagación de orquídeas* (Primera ed.). México.
- Ministerio del Ambiente. (Septiembre de 2013). *Ministerio del Ambiente*. Obtenido de: Sistema nacional de control forestal: <http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/07/CONTROL-FORESTAL.pdf>



- Mites, M. (2008). *Criteria used to set export quotas for appendix I and II orchid species from ecuador*. Obtenido de CiteSerrX: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.625.5685&rep=rep1&type=pdf>
- Mosquera-Espinosa, A. T., Bayman, P. & Otero, J. T. (2010). *Ceratobasidium* como hongo micorrízico de orquídeas en Colombia. *Acta Agron*, 59, 316-326.
- Newman, B., Ladd, P., Batty, A. & Dixon, K. (2007). Ecology Of Orchids In Urban Bushland Reserves - Can Orchids Be Used As Indicators Of Vegetation Condition?. *Lankesteriana International Journal on Orchidology*, 7 (1-2), 313-315.
- Ordóñez, N. F., Diez-Gomez, M. C., & Otero, J. T. (2012). La vainilla y los hongos formadores de micorrizas. *Orquideología*, 29(63), 56–69.
- Ordoñez, N. (2012). *Efecto de hongos endófitos de orquídeas del grupo rhizoctonia y otros endófitos cultivables sobre el desarrollo de plantas de Vanilla planifolia Jacks*. Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/6760/1/52518492.2012.pdf>
- Otero Ospina, J. T., Ackerman, J. D. & Bayman, P. (2004). Differences in mycorrhizal preferences between two tropical orchids. *Molecular Ecology*, 13(8), 2393–2404.
- Otero Ospina, J. T., Ackerman, J. D. & Bayman, P. (January de 2005). Variation in mycorrhizal performance in the epiphytic orchid *Tolumnia variegata* in vitro: the potential for natural selection. *Evolutionary Ecology*, 19(1), 29-43.
- Otero Ospina, J. T., & Bayman, P. (2009). Germinación simbiótica y asimbiótica en semillas de orquídeas epífitas. *Acta Agronómica*, 58(4), 270–276.
- Pereira, O. L., Megumi Kasuya, M. C., Borges, A. C. & Fernandes de Araújo, E. (2005). Morphological and molecular characterization of mycorrhizal fungi isolated from neotropical orchids in Brazil. *Canadian Journal of Botany*, 83, 54-65.
- Pereira, M.C., Torres, D.P., Guimaraes, F.A.R., Pereira, O.L. & Kasuya, M.C. (2011). Germinação de sementes e desenvolvimento de protocormos de *Epidendrum secundum* Jacq. (Orchidaceae) em associação com fungos micorrízicos do gênero *Epulorhiza*. *Acta Botanica Brasilica* 25(3): 534-541.
- Pérez, B., & Castañeda, S. (2016). Propagación in vitro de orquídeas nativas como



- Peterson, R.L., Massicotte, H.B. & Melville, L.H. (2004). *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. NRC Research Press.
- Portilla, J., Días, A. & Salazar, L. (2007). *Orquídeas Manual de cultivo*. Cuenca: Hernandez.
- Rangel Osorio, J. (2014). *Establecimiento de cultivos in vitro de albahaca (ocimum basilicum) para la producción de aceite esencial*. Universidad Autónoma del Estado de México. Retrieved from <http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/14819/Tesis.417185.pdf?sequence=1>
- Rasmussen, H.N. (2002). Recent developments in the study of orchid mycorrhiza, *Plant and Soil* 244: 149-163.
- Rasmussen, H. N., Dixon, K. W., Jersáková, J., & Těšitelová, T. (2015). Germination and seedling establishment in orchids: A complex of requirements. *Annals of Botany*, 116(3), 391–402.
- Salazar-Mercado, S. A. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (*Orchidaceae*). *Acta Agronomica*, 61(1), 69–78.
- Salazar-Mercado, S. A., & Cancino, G. O. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación in vitro de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona, Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.*, 14(1), 53–59.
- Sandoval, J., Brenes, G. & Perez-Sánchez, L. (1991). *Micropropagación de Platano Y Banano (musa Aab, Aaa) en El Catie*. Turrialba: Catie.
- Seaton, P. & Ramsay, M. (2009). *Cultivo de Orquídeas por semillas*. (J. Warner, Trad.) Kew, Richmond, Reino Unido: Royal Botanic Gardens.
- Segretin, M. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología.*, 2, 5-8.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). Agricultura protegida: el valor de la producción bajo esta técnica creció 47.9% en 2016. Retrieved from <https://www.gob.mx/siap/articulos/agricultura-prottegida-el-valor-de-la-produccion->



- Siqueira, J. & Franco, A. A. (1988). *Biotecnología do solo: fundamentos e perspectivas*. Brasília: DF: MEC: ABEAS; Lavras: ESAL: FAEPE.
- Snech B., Burpee, L. & Ogoshi, A. (1991). Identification of Rhizoctonia Species. *The American Phytopathological Society*, 133. St. Paul, Minnesota, USA.
- Spoerl, E. (1948). Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. *American Journal of Botany*, 35(2), 88-95.
- Stewart, S. & Kane, M. (2006). Symbiotic seed germination of *Habenaria macroceratitis* (Orchidaceae), a rare Florida terrestrial orchid. *Plant cell, tissue, and organ culture*, 86(2), 159-167.
- Stewart, Scott & Zettler, Lawrence. (2002). Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany - AQUAT BOT.* 72. 25-35. 10.1016/S0304-3770(01)00214-5.
- Thomé-Ortiz, H., Tejeda-Sartorius, O., Téllez-Velasco, M. & Torres-Rivera, J. A. (2017). Las orquídeas (*orchidaceae*) como recurso turístico: Propuesta de senderos interpretativos como herramienta de gestión forestal sustentable. *Agroproductividad*, 10, 54-59.
- Vargas, D. (2012). Establecimiento de un protocolo para el cultivo in vitro de semillas de *Cattleya violacea*, 1–96. Retrieved from <http://www.archivos.ujat.mx/2011/difusion/libros/11.pdf>
- Velasco Ortega, L. & Beltrán Barea, P. (Julio de 2008). *Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio*. Recuperado el 20 de Julio de 2017, de Junta de Andalucía: http://www.jolube.es/pdf/Orquideas_Grazalema_2008.pdf
- Zettler, Lawrence. (1997). Terrestrial orchid conservation by symbiotic seed germination: Techniques and perspectives. *Selbyana*. 18. 188-194.
- Zettler, L., Poulter, S. & McDonald, K. (2007). Conservation-driven Propagation of an Epiphytic Orchid (*Epidendrum nocturnum*) with a Mycorrhizal Fungus. *HortScience*, 135-139.



11 ANEXOS

ANEXO A. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

ANEXO A1. SOLUCIONES MADRE: PREPARACIÓN DE 100 ML

- **Solución A:** Nitrato de amonio 1650 mg, Nitrato de potasio 1900 mg
- **Solución B:** Sulfato de magnesio 370 mg, Sulfato de manganeso 22,3 mg, Sulfato de zinc 8,6 mg, Sulfato cúprico 0,025 mg
- **Solución C:** Cloruro de calcio 440 mg, Yoduro de potasio 0,83 mg, Cloruro de cobalto 0,025 mg
- **Solución D:** Fosfato de potasio 170 mg, Ácido bórico 6,2 mg, Molibdato de sodio 0,25 mg
- **Solución E:** Sulfato ferroso 27,81mg, Na Edta 37,31 mg

ANEXO A2. MEDIO MS MODIFICADO COCO:

1. En 1000 ml de agua añadir 10 ml de las soluciones A, B, C, D y E
2. Adicionar: Carbón activado 2 g, Azúcar 20 g, Agar 7,5 a 8,5 g, Agua de coco 150 ml, Tween 5 gotas
3. Calibrar el pH a 5,6 y hervir la mezcla por 1 minuto
4. Colocar vitamina B1
5. Repartir en frascos y esterilizar

ANEXO A3. MEDIO PDA (AGAR PAPA DEXTROSA):

En 1000 ml de agua añadir:

- Agar 20 g
- Puré de papa 10 g
- Azúcar 20 g

Calibrar el pH a 5,6 y hervir la mezcla por 1 minuto

Repartir en frascos y esterilizar

ANEXO A4. MEDIO OMA (AGAR AVENA):

En 1000 ml de agua añadir:


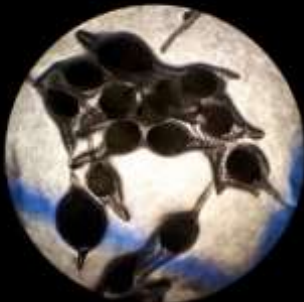

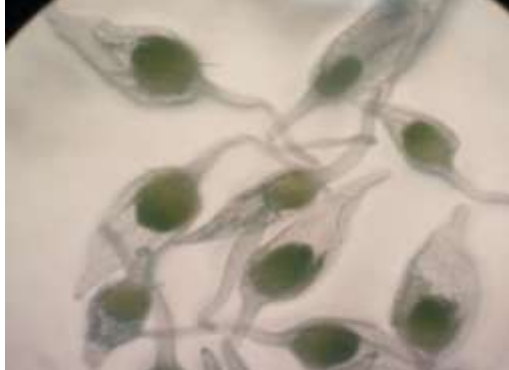
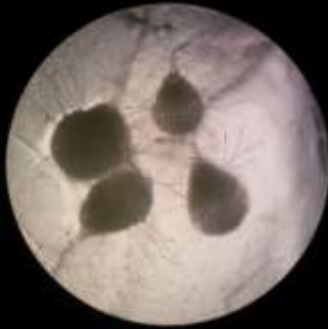



- Agar 7 g
- Avena 2,5 g

Hervir la mezcla por 1 minuto

Repartir en frascos y esterilizar






ANEXO B. VISUALIZACIÓN DE CAMPOS CON LENTE DE AUMENTO A LOS 30 Y 60 DÍAS POSTERIORES A LA SIEMBRA

	Día 30	Día 60
T1		
T2		
T3		
T4		






ANEXO C. FOTOS COMPARATIVAS DE LOS TRES ENSAYOS

ANEXO C1. FOTOS COMPARATIVAS DE LOS TRES ENSAYOS A LOS 30 DÍAS

ENSAYO	30 días			
1				
	T1	T2	T3	T4
2				
	T1	T2	T3	T4
3				
	T1	T2	T3	T4



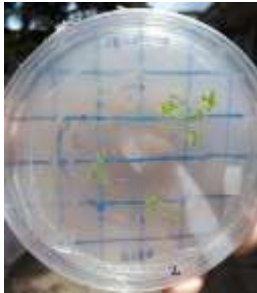




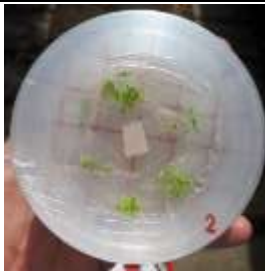






ANEXO C2. FOTOS COMPARATIVAS DE LOS TRES ENSAYOS A LOS 60 DÍAS

ENSAYO	60 días			
1				
	T1	T2	T3	T4
2				
	T1	T2	T3	T4
3				
	T1	T2	T3	T4

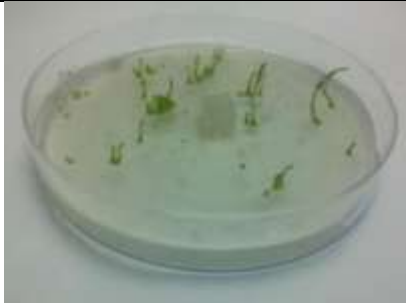







ANEXO D. FOTOS COMPARATIVAS DE LOS TRES ENSAYOS A LOS 60 DÍAS

Día 60			
Ensayo 1			
			
T1	T2	T3	T4
Ensayo 2			
			
T1	T2	T3	T4
Ensayo 3			
			
T1	T2	T3	T4



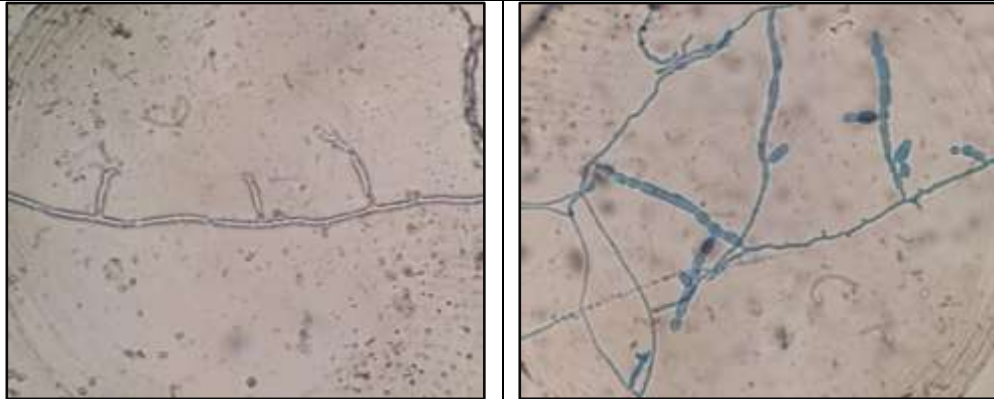
ANEXO E. FOTOS COMPARATIVAS LUEGO DE LOS 60 DÍAS

	T3	T4
Ensayo 1		
Ensayo 2		
Ensayo 3		

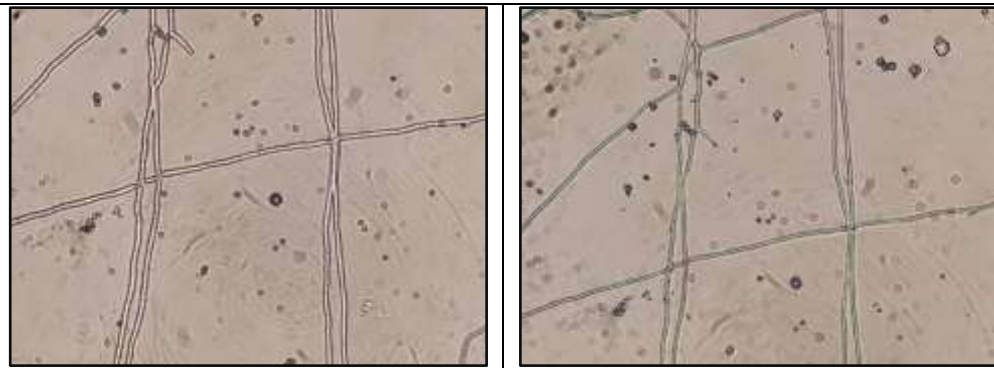


ANEXO F. RESULTADOS DEL MICROCULTIVO

***Ceratobasidium* sp. observado al microscopio a 40 X**



***Sebacina vermifera*. observado al microscopio a 40 X**





ANEXO G. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN DE LOS TRES ENSAYOS

Ensayo 1																
Día	Estadio 0				Estadio 1				Estadio 2		Estadio 3		Estadio 4		Estadio 5	
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T3	T4	T3	T4	T3	T4	T3	T4
5	100	96,9	76	64,4	0	3,1	24	35,6	0	0	0	0	0	0	0	0
10	100	96,7	63,2	42	0	3,4	36,8	31,2	0	26,8	0	0	0	0	0	0
15	100	93,3	54,5	37	0	6,7	40,7	26,1	4,8	27	0	10	0	0	0	0
20	100	91,9	47,5	34,1	0	8,1	38,8	25,1	13,8	24,3	0	15,6	0	1	0	0
30	100	89,3	40,8	31,8	0	10,7	23	10,7	35,3	20,7	1	18,8	0	16,1	0	1,9
40	100	86,8	33,1	28,6	0	13,2	9,9	11,2	49,9	11,7	5,7	24,3	1,4	15,8	0	8,4
60	100	84,4	30,3	28,3	0	15,3	3,2	8,4	20,2	9,7	17,5	17,4	21,9	15	6,9	21,3

Ensayo 2																
Día	Estadio 0				Estadio 1				Estadio 2		Estadio 3		Estadio 4		Estadio 5	
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T3	T4	T3	T4	T3	T4	T3	T4
5	100	97,6	72,2	46,7	0	2,4	27,8	50,3	0	0	0	0	0	0	0	0
10	100	96,5	60,3	34	0	3,5	39,7	32,2	0	33,7	0	0	0	0	0	0
20	100	94	46,6	14,9	0	6	37,6	26,5	15,8	38	0	20,6	0	0	0	0
30	100	91,6	37,8	9,4	0	8,4	34	15,5	25,4	36,4	2,9	32,5	0	5,8	0	0,4
40	100	88,5	27	9	0	11,6	14,1	8,4	46,7	13,2	10,3	29,4	2	27,6	0	12,5
60	100	97,8	9,8	8,1	0	12,2	3,3	3,2	10	5,7	33,7	19,1	30,9	20,5	10,4	43,3

Ensayo 3																
Día	Estadio 0				Estadio 1			Estadio 2			Estadio 3		Estadio 4		Estadio 5	
	T1	T2	T3	T4	T2	T3	T4	T2	T3	T4	T3	T4	T3	T4	T3	T4
5	100	84,8	70,6	52,4	15,2	29,4	47,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	100	76,4	47	22,5	23,6	51,8	36	0	1,2	41,5	0	0	0	0	0	0
20	100	71,6	35,5	14,1	28,4	48,1	14,9	0	15,8	45,8	0,6	25,3	0	0	0	0
30	100	57,6	27,5	11,1	42,4	48,4	10,7	0	21,1	16,5	3,1	55,4	0	6,4	0	0
40	100	51,5	13	10,5	47,5	17,2	3,3	1	30,6	3,9	36,9	26,3	2,3	36,7	0	19,3
60	100	45,4	8,6	9,4	52,5	3,4	2,4	2,1	11,9	2,7	37	8,4	32,1	23,8	7,1	53,2



ANEXO H. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN SIMBIÓTICA

ANEXO H1. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN SIMBIÓTICA CON *CERATOBASIDIUM* SP. DURANTE EL TIEMPO DE EVALUACIÓN DE LOS TRES ENSAYOS

ESTADIO	5 Días (%)	20 Días (%)	30 Días (%)	40 Días (%)	60 Días (%)
E0	54,5	21,0	17,5	16,0	15,3
E1	44,5	22,2	12,3	7,6	4,6
E2	0,0	36,0	24,5	9,6	6,0
E3	0,0	20,5	35,5	26,7	15,0
E4	0,0	0,3	9,4	26,7	19,8
E5	0,0	0,0	0,8	13,4	39,3

ANEXO H2. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN SIMBIÓTICA CON *SEBACINA VERMIFERA* DURANTE EL TIEMPO DE EVALUACIÓN DE LOS TRES ENSAYOS

ESTADIO	5 Días (%)	20 Días (%)	30 Días (%)	40 Días (%)	60 Días (%)
E0	72,9	43,2	35,3	24,3	16,2
E1	27,1	41,5	35,1	13,7	3,3
E2	0,0	15,1	27,3	42,4	14,0
E3	0,0	0,2	2,3	17,6	29,4
E4	0,0	0,0	0,0	1,9	28,3
E5	0,0	0,0	0,0	0,0	8,1



ANEXO I. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS DE LA SIEMBRA

ANEXO I1. PRIMER ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS DE LA SIEMBRA

ESTADIO	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)
E0	100,0	89,3	40,8	31,8
E1	0,0	10,7	23,0	10,7
E2	0,0	0,0	35,3	20,7
E3	0,0	0,0	1,0	18,8
E4	0,0	0,0	0,0	16,1
E5	0,0	0,0	0,0	1,9

ANEXO I2: SEGUNDO ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS DE LA SIEMBRA

ESTADIO	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)
E0	100,0	91,6	37,8	9,4
E1	0,0	8,4	34,0	15,5
E2	0,0	0,0	25,4	36,4
E3	0,0	0,0	2,9	32,5
E4	0,0	0,0	0,0	5,8
E5	0,0	0,0	0,0	0,4

ANEXO I3. TERCER ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 30 DÍAS DE LA SIEMBRA

ESTADIO	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)
E0	100,0	57,6	27,4	11,1
E1	0,0	42,4	48,4	10,7
E2	0,0	0,0	21,1	16,5
E3	0,0	0,0	3,1	55,4
E4	0,0	0,0	0,0	6,4
E5	0,0	0,0	0,0	0,0



ANEXO J. PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS DE LA SIEMBRA

ANEXO J1. PRIMER ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS DE LA SIEMBRA

ESTADIO	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)
E0	100,0	84,4	30,3	28,3
E1	0,0	15,3	3,2	8,4
E2	0,0	0,3	20,2	9,7
E3	0,0	0,0	17,5	17,4
E4	0,0	0,0	21,9	15,0
E5	0,0	0,0	6,9	21,3

ANEXO J2. SEGUNDO ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS DE LA SIEMBRA

ESTADIO	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)
E0	100,0	87,8	9,8	8,1
E1	0,0	12,2	3,3	3,2
E2	0,0	0,0	10,0	5,7
E3	0,0	0,0	33,7	19,1
E4	0,0	0,0	30,9	20,5
E5	0,0	0,0	10,4	43,3

ANEXO J3. TERCER ENSAYO, PORCENTAJES DE GERMINACIÓN A LOS 60 DÍAS DE LA SIEMBRA

	T1 (%)	T2 (%)	T3 (%)	T4 (%)
E0	100,0	45,4	8,6	9,4
E1	0,0	52,5	3,4	2,4
E2	0,0	2,1	11,9	2,7
E3	0,0	0,0	37,0	8,4
E4	0,0	0,0	32,1	23,8
E5	0,0	0,0	7,1	53,2



12 GLOSARIO

Apical: Es el extremo superior o punta de cualquier órgano externo de la planta (por ejemplo, de la hoja).

Arbúsculos: Es la estructura más característica de una endomicorriza. Se llama así porque tiene forma de pequeño arbolito. En realidad es la forma el hongo micorrízico cuando se mete dentro de una célula de la raíz de la planta que coloniza, e inicia el intercambio de nutrientes hongo-planta.

Aséptico: Se le denomina así a aquello que está libre de algún tipo de infección o de contaminación.

Basal: Situado o ubicado en la base de una formación orgánica de la semillas o protocormo.

Basidiomicetos: Los basidiomicetos (Basidiomycota) son una división del reino Fungi que incluye los hongos que producen basidios con basidiosporas. Contiene a las clásicas setas y hongos con sombrero.

Cotiledón: Los cotiledones son las primeras hojas que desarrollan las plantas, no tienen la morfología que desarrollarán el resto de las hojas de la planta. Su morfología es simple, ovalada o acorazonada y no se parece a la hoja verdadera de la planta ni en su forma, su tamaño, ni en su coloración.

Deforestación: Es un proceso provocado generalmente por la acción humana, en el que se destruye la superficie forestal.

Endémicas: Las especies endémicas son seres vivos, que incluyen tanto la flora como la fauna, cuya distribución se restringe a una determinada zona geográfica.

Endospermo: Es un tejido existente en las semillas de la mayoría de las plantas. Este endospermo comúnmente rodea el embrión y sirve como su almacén de nutrientes durante la germinación y primeras etapas de la vida.

Epifitas: Se refiere a cuando una planta que crece sobre otro vegetal usándolo solamente como soporte, pero no lo parasita nutricionalmente siendo sólo una parasitosis mecánica

Estadios: Se refiere a la fase de un proceso.

Exógena: El término es utilizado para hacer referencia a algo que es originado o que existe en el exterior de una cosa, en contraposición a endógeno.



Filiformes: Se refiere a los objetos que tienen forma o apariencias de hilo, finas y alargadas.

Fotosíntesis: Proceso químico que tiene lugar en las plantas con clorofila y que permite, gracias a la energía de la luz, transformar un sustrato inorgánico en materia orgánica rica en energía.

Hábitat: Conjunto de factores físicos y geográficos que inciden en el desarrollo de un individuo, una población, una especie o grupo de especies determinados.

Hifa: Son una red de filamentos cilíndricos que conforman la estructura del cuerpo de los hongos multicelulares. Están constituidos por una fila de células alargadas y tubulares, envueltas por una pared celular

Inoculo (Inoculan): Es la Cantidad o Número de Gérmenes infectantes que son introducidos accidental o voluntariamente en los tejidos vivos o en medios de cultivos especiales

Litófitas: Son las plantas que crecen en asociación con rocas. Sus tallos, rizomas o tubérculos crecen en depósitos de humus en los huecos o rajaduras de las salientes rocosas o en cavidades formadas por la erosión

Primordio: Conjunto de células embrionarias que tiene la propiedad de dividirse a un ritmo considerable para formar los distintos órganos de la planta.

Protocormo: Tejido carnoso con pocas células formado de un embrión rudimentario en las semillas de las *Orchidaceae*, usado para designar ese estado del desarrollo de los embriones de las orquídeas.

Red de Hartig: Es una red de hifas de hongos micorrízicos que se extiende dentro de las raíces de las plantas, penetrando entre las células epidérmicas y corticales. Esta red es un sitio de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta hospedante.

Rizoides: Son una estructura equivalente a la raíz o parte inferior de las. Es una estructura celular filiforme vinculada a las funciones de fijación y absorción de agua y nutrientes.

Septo: Pared que separa dos cavidades o dos masas de tejido.

Simbiosis: Asociación de individuos animales o vegetales de diferentes especies, en la que ambos asociados sacan provecho de la vida en común.



Teleomorfo: Estadio reproductivo sexual (morfo), típicamente desarrolla un cuerpo de fructificación.

Testa: Es la más externa de las dos capas que constituyen el episperma o tegumento que rodea a la semilla de las plantas espermatófitas.